Feel so Bio 19キットシリーズ

#004　DNA切断 キット

取扱説明書

ver.1.2



nest リバネス Leave a nest 身近なふしぎを興味に変える

コスモ・バイオ株式会社

目次

本キットの特徴

　本キットは、遺伝子工学において最も重要な働きを持つ酵素の一つ、「制限酵素」について学ぶキットです。

　ラムダ・ファージのDNAを、特定の塩基配列を認識してDNAを切断する酵素「制限酵素」で処理することにより、より短い断片に消化します。

　本キットは、Feel so Bio 19キットシリーズ＃005「DNA結合キット」とセットで実験を行うことにより、現在の遺伝子工学で中心的な技術となっている遺伝子のクローニング技術について学習することが可能です。

キット使用時に必要な試薬・機材等の一覧

キット内容（生徒20名（2人一組）分）

ラムダDNA溶液	(110μL)	1本
制限酵素　*Hind*III	(20μL)	1本
制限酵素バッファー	(20μL)	1本
精製水	(20μL)	1本
ローディングバッファー	(70μL)	1本
DNAマーカー	(60μL)	1本
40倍濃縮電気泳動バッファー	(25mL)	1本
アガロース	(2g)	1袋
マイクロチューブ	(50本)	1袋
取扱説明書（本書）		1冊

本キット以外に必要な試薬・機材一覧

マイクロピペット（20μL用）
マイクロピペット用チップ
37℃恒温槽
電気泳動槽
DNA染色液（株式会社アドバンス社のMupid Blueを推奨しています。）
染色用タッパー
脱色用タッパー
精製水

内容物について

ラムダDNA溶液

ラムダ・ファージ由来のDNAであるラムダDNAを含む溶液です。DNAの分解を防ぐ目的でTEバッファーに溶解してあります。必ず氷上で融解し、使用時も氷上に静置してマイクロチューブを温めないようご注意ください。また、使用後は速やかに-20℃に戻し、保存してください。

制限酵素

Haemophilus influenzae Rd.由来の制限酵素*Hind*IIIです。酵素は常温では短時間で失活しますので、**必ず-20℃にて保存してください**。制限酵素は使用時には必ず氷上に置き、チューブを温めないようにご注意ください。使用後は速やかに-20℃に戻し、保存してください。本酵素は、37℃で最も高いDNA切断活性を示します。

制限酵素バッファー

制限酵素*Hind*IIIが最も高いDNA切断活性を発揮するように調製されたバッファーです。-20℃にて保存してください。10倍に濃縮されておりますので、反応溶液の1/10量を使用ください。

＜組成＞Tris-HCl 6mM、MgCl2 6mM、NaCl 100mM、DTT 1mM、

（37℃におけるpHは7.5）

精製水

DNA分解酵素、RNA分解酵素が含まれていない精製水です。-20℃にて保存してください。

アガロース

核酸、タンパク質などの生体高分子を完全に除去した精製アガロースです。高温多湿をさけ、常温にて保存してください。

ローディングバッファー

DNAサンプルをアガロースゲルにアプライする際に使用します。常温にて保存してください。色素を含むため、手や衣服につくと落ちにくいので、取り扱いには十分にご注意ください。

40倍濃縮電気泳動バッファー

40倍の濃度に濃縮したTAE（トリス-酢酸-EDTA）バッファーです。アガロースゲルの作成および、DNAサンプルをアガロースゲル電気泳動法により分離する際の泳動バッファーとして使用します。4℃にて保管してください。電気泳動用バッファーとして使用の際は、精製水で40倍に希釈してご使用ください。

※内容物が微量なため、マイクロチューブの蓋についていることがございます。その際には、手で振ってマイクロチューブの底に溶液を集めてからご使用ください。

分注について

・班構成

本実験キットでは４人１班（実験は２人一組で行なう）を推奨しています。

・機材一班分

ラムダDNA	･･･20μL
制限酵素　*Hind*III	･･･3μL
制限酵素バッファー	･･･3μL
精製水	･･･3μL
ローディングバッファー	･･･12μL
DNAマーカー	･･･10μL
40倍濃縮電気泳動バッファー	･･･100mL　(40倍希釈後)
アガロース	･･･1個
マイクロチューブ	･･･8本 (試薬分注用6本、反応用2本)

※内容物についての項、及び実験手順の項に従って試薬を溶解してください。

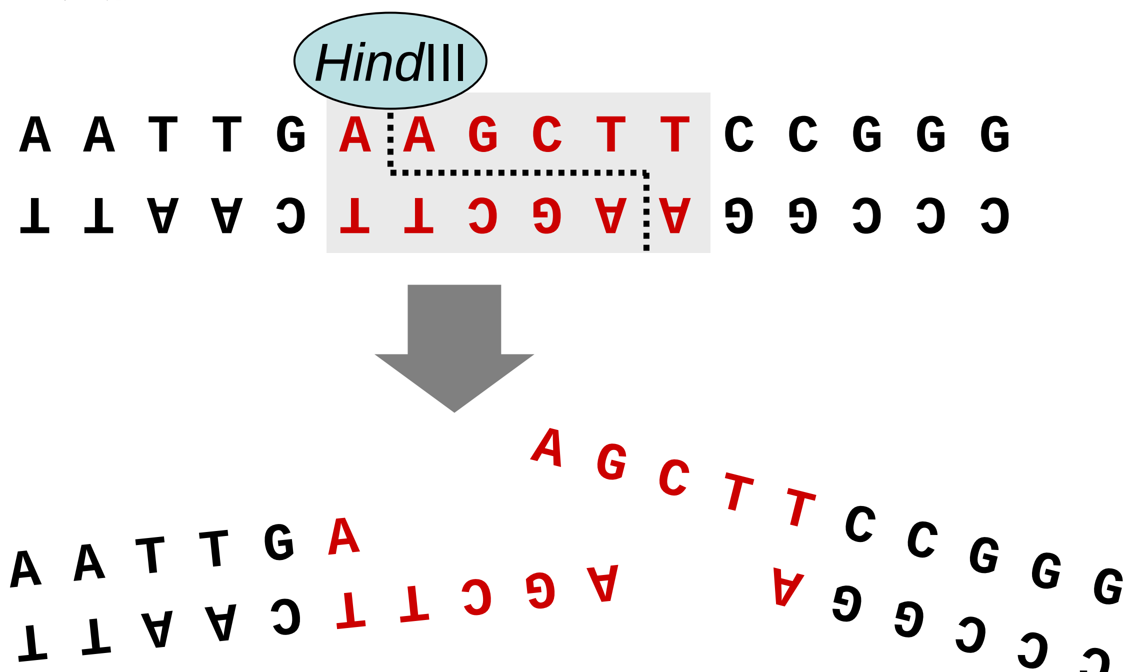
制限酵素について

制限と制限酵素

　細菌は自分以外のDNAを切断・分解することで、ウイルスやファージなどの外から侵入してくるDNAを排除しています。この外来DNAの排除メカニズムは「制限」と呼ばれています。制限で中心的な役割をする酵素が「制限酵素」です。制限酵素は特定のDNAの配列を認識して切断することが知られています。
　本キットでは、 *Haemophilus influenzae* Rd.が持っている制限酵素を用いてラムダ・ファージ由来のDNAの配列を切断します。

制限酵素の性質

　制限酵素は、特定のDNAの配列を認識し切断する酵素です。大部分の制限酵素は4塩基、6塩基または8塩基の、特定のDNAの配列を認識し、切断します。
　制限酵素の大きな特徴は、その認識するDNAの配列がパリンドローム（回文）構造をとっていることです。パリンドローム構造とは、「シンブンシ（新聞紙）」のように前から読んでも後ろから読んでも同じことを指しますが、2本鎖のDNAにおけるパリンドローム構造とは下図のような配列（灰色四角）を指します。本キットで用いる制限酵素*Hind* IIIは下図のパリンドローム配列（赤字）を認識して特定の箇所（点線の部分）で切断します。



アガロースゲル電気泳動の原理

アガロースゲル電気泳動法とは

アガロース電気泳動法は、DNAやRNAなどの核酸をそれらの電気的な性質を利用して分離する方法です。核酸は「－」の電荷を帯びているため、電場に置かれると、アガロース（※）のゲルの網目構造内を＋極側に移動します。長いDNA断片は網目構造内をゆっくりと（引っかかりながら）動くのに対して、短いDNA断片はより速く（あまり引っかからずに）動くことから、アガロースゲル電気泳動法では、DNA断片を長さによって分離することが可能です。この方法はバイオテクノロジーの研究においてDNA断片の際に用いられる最もポピュラーな方法であり、現在のバイオテクノロジーを支える最も基本的な技術です。

※アガロースとは？

アガロースとは、「寒天」のことです。二種類の糖が結合しあって網目状の構造をとることから、生体高分子、特にDNAの分子量を分析する際によく利用されます。

DNAの電気的性質

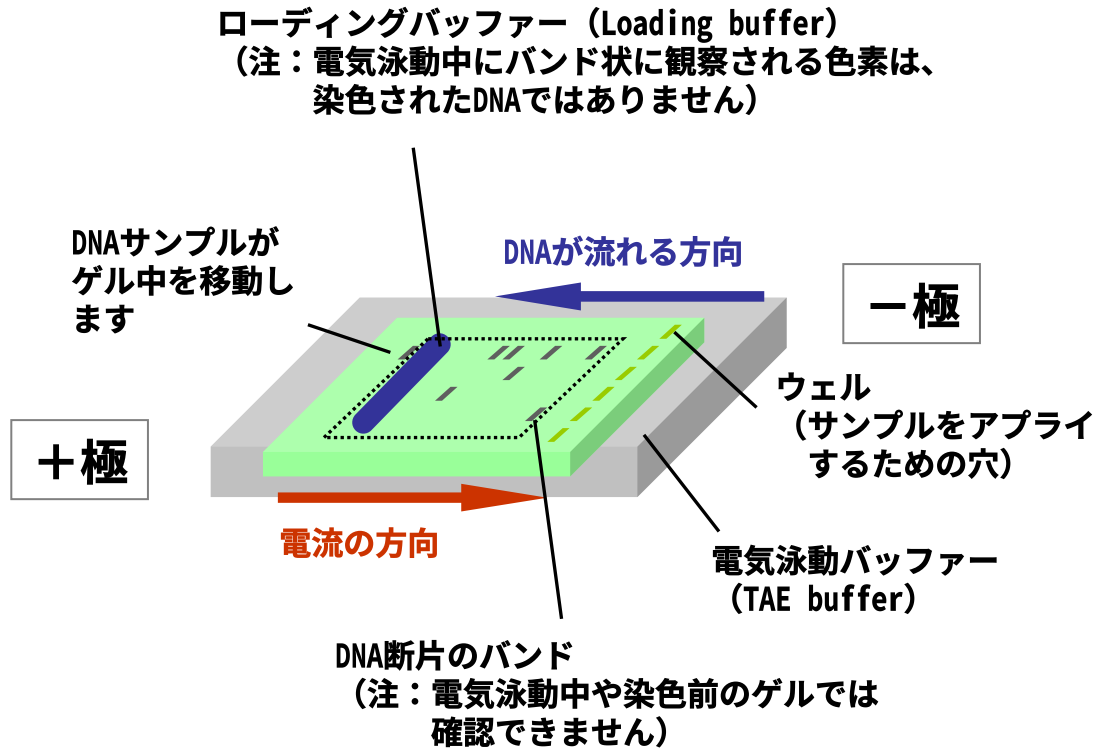
DNAは、リン酸基・塩基・デオキシリボース（糖の一種）によってできる「ヌクレオチド」とよばれる分子が直鎖状につながった構造をとっています。このうちリン酸基と塩基が荷電しています。

DNAの場合、塩基の荷電は二重鎖構造をとるために打ち消されているので、水溶液中ではリン酸基のみが荷電しており、したがってDNAはヌクレオチド数、すなわち分子量（※）に比例した電荷を持っていることになります。これはDNAの電気的な性質で最も重要な点です。

※DNAはヌクレオチドが直鎖状につながった構造をとるため、分子量はそのヌクレオチド数に比例します（塩基の種類によって多少の誤差が生じます）。一般的にDNAの大きさは分子量で表わさずヌクレオチドの長さ（塩基対数、base pair：bp）で表わします。

アガロースゲル電気泳動法では、このようなDNAの電気的な性質を利用します。アガロースによるゲルマトリックス（アガロースゲル）内に電圧をかけることで電場を生じさせ、DNA断片を長さ（単位は塩基対を意味するbp:base pair）によって分離します。DNAは二重らせんとよばれる単一な構造をとっているため、DNAは分子量による移動度の差によって分離することができます。

下の図は、アガロースゲル電気泳動の模式図を示しています。アガロースゲル電気泳動を行う際には、サブマリン電気泳動槽とよばれる機器を使用します。まず電気泳動槽を、導電性でかつDNAの分解が起こりにくいTAEバッファーで満たし、TAEバッファー中にアガロースゲルを静置します。アガロースゲルには、ウェルとよばれるサンプルを注入（アプライ）するための穴があり、ここにDNAサンプルをマイクロピペットを用いてアプライします。DNAサンプルのアプライ後のゲルに電圧をかけ電流を流すことでDNA断片をサイズによって分離することができます。



DNAサンプルを電気泳動する際には、あらかじめDNAサンプルをローディングバッファーと混和します。これによりDNAサンプルは、泳動バッファー中に拡散することなく、ウェル内にアプライすることが可能となります。ローディングバッファーには、電気泳動中にサンプルの移動度の目安となる色素や、ウェルにDNAサンプルを沈ませるためのグリセロールなどが含まれています。

あらかじめDNA断片のサイズの分かっているDNAサンプルを「DNAのモノサシ」として隣のレーンに電気泳動することで、未知のサンプルの分子量を検討することも可能です。

電気泳動の終了後は、DNA断片を可視化するために染色します。DNA染色に用いられる試薬としては、エチジウムブロマイド（EtBr）、Mupid Blueなどが挙げられます。EtBrは検出感度に優れていますが、DNAの二重鎖の間に入り込む（インターカレーションする）物質であり、発がん性が認められます。また、DNA断片のバンドの観察の際に紫外線ランプが必要となるため、ビニール手袋を必ず着用し、防護メガネを使用するなど、取扱いには十分な注意が必要です。本キットでは、安全なMupid Blueを使用します。

電気泳動の準備と手順

実験の手順（実験前に準備していただくこと）

① **電気泳動バッファーの作成**

40倍濃縮泳動バッファーを975㎖の精製水で40倍に希釈します。本キットで使用を推奨している電気泳動層、Mupid-Sでは電気泳動バッファーを約100㎖/台使用します。

② **アガロースゲルの作成**

１）300㎖の三角フラスコに1.4gのアガロースを入れ ①で作成した1xTAEバッファー200㎖を加えよく混ぜます。三角フラスコの口をラップで軽く閉じ電子レンジで加熱してアガロースを完全に融解させます。この作業はアガロースの粒子が見えなくなるまで行ってください。加熱の際は、沸騰による噴出に注意してください。なお、この作業は突沸した水蒸気が手にかかるなどやけどの危険性がありますので、必ず軍手の上にビニール手袋をして作業を行ってください（この作業はやけどの危険があります。必ず指導者が行うようにしてください）。

２）溶解させたアガロースは、電気泳動槽付属のゲルメーカーを用いて成型します。②で融解したアガロースを、ある程度（50℃程度）まで冷ました後、ゲルメーカーに流し込み、上からウェルを作成するためのコームを差し込みます。アガロースが固まるまで上からアルミホイルで覆い、静置してください。

※200㎖のアガロース溶液で、小さいゲルが約8枚、大きなゲルでは4枚作成できます。ゲルメーカーが一個しかない場合で、小さいゲルを4枚以上作成したいときには、１）のステップで、0.7gのアガロースを100㎖の泳動バッファーに溶かすなどして、小分けにゲル作成を行なってください。また、一度固まってしまったゲルでも、再度レンジで温めることで溶解し、ゲルを作成することが可能です。

作成したアガロースゲルは、希釈後の泳動バッファーに浸した状態で一ヶ月程度常温保存が可能です。また、使用前にはウェルの底に穴が開いていないことを目視で確認してください。

実験手順

1）恒温槽を37℃にセットします。

2）氷上でラムダDNA溶液、制限酵素バッファー、精製水を融解させます。

3）マイクロチューブに制限酵素バッファー 1μL、ラムダDNA溶液 8μLを入れ、マイクロピペットで均一に混ぜあわせます。この混合溶液を各班につき2本ずつ作成し、マイクロチューブの蓋に一方は「①」他方には「②」と油性ペンで記入します。

4）3）で作成した混合溶液を氷上で5分間、静置してください。

5）各班2本のマイクロチューブ「①」には*Hind*IIIを1μL加え、「②」には精製水1μLを加えてください（※）。それぞれの混合溶液はマイクロピペットで均一になるよう混ぜあわせてください（注：*Hind*IIIを入れたマイクロチューブは、必ず氷上に置いて作業してください。使用後は速やかに-20℃へ移動してください）。

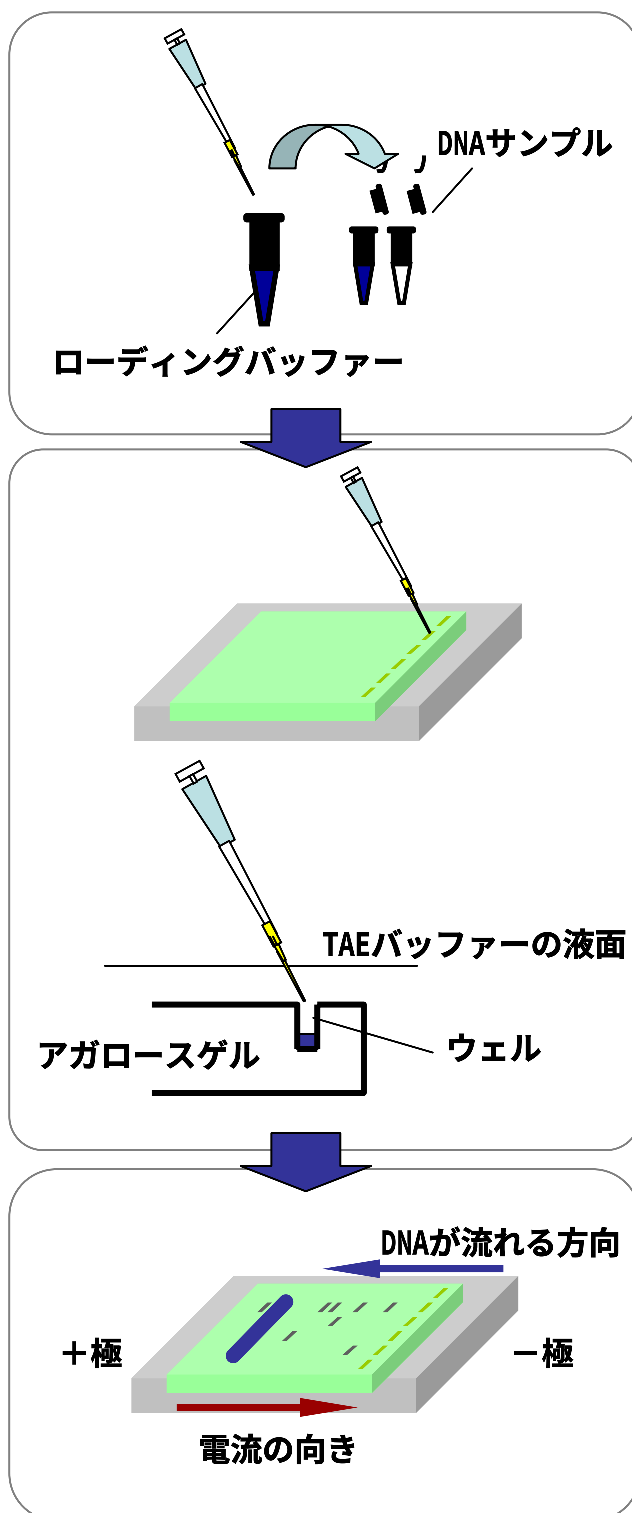
6）フローターにチューブをさし、37℃の恒温槽へ移して60分間静置してください（注：室温でも酵素反応は可能ですが、酵素の活性が弱くなるため切断が不完全になったり、切断の確認が難しくなる可能性がありますのでご了承ください）。

※　②のように、制限酵素を加えないサンプルを調整することで、制限酵素による作用を確かめることができます。制限酵素は十分量ございますので、両方のチューブに制限酵素を加えることも可能です。

実験の手順

①　電気泳動槽の準備

　電気泳動槽に電気泳動バッファーを加え、電気泳動槽内のマイナス極側にウェルが来るようにアガロースゲルをセットします。アガロースゲルのウェルが必ず電極と平行になるようにセットしてください。使用する電気泳動バッファーの量は、電気泳動槽によって異なりますので、電気泳動槽の取扱説明書に従い、適切な量をご使用ください（参考：Mupid-Sでは約100mL程度）。



②　DNAサンプルの調整

　本キット添付のローディングバッファーを2μLずつ酵素処理の終了したチューブに加えよく混ぜます（合計12μL）。DNAマーカーにも2μLのローディングバッファーを加えてよく混ぜてください。

③　DNAサンプルのアプライ

　PCRサンプルを別々のウェルにアプライします。

　アプライは、右図のようにチップの先をウェル内まで入れないようにします。チップの先端でウェルを破壊しないよう、細心の注意を払ってください。

④　アガロース電気泳動

　電気泳動槽の電源スイッチを入れ、電気泳動を開始します。DNAはマイナスの荷電を持っていますので、プラス極側に移動します。くれぐれも感電にご注意ください（参考：Mupid-Sでの電気泳動条件は100ボルトで20分程度となります）

⑤　アガロースゲルの染色

　次ページ「DNA染色の方法」をご覧ください。

DNA染色の推奨方法

＜Mupid Blueを使用したDNA染色法＞

Mupid Blue

50倍に濃縮されたDNAの染色液です。電気的性質によってDNAと結合することで青色を呈するため、電気泳動の結果を確認することが可能です。インターカレーション型と呼ばれる染色液と異なり、発がん性がなく安全な試薬です。常温にて保存し、使用の際は精製水にて50倍に希釈してご使用ください。

DNA染色液による染色では脱色の操作が必要となります。脱色の操作では精製水を用います。

※ DNA染色液は無害ですが色素を含んでおり、衣服・皮膚などに付くと汚れますので取扱いの際にはビニール手袋・白衣等を着用することをお勧めします。

① DNA染色液を精製水で50倍希釈し、タッパーに入れる。脱色用の水をタッパーに用意しておく。

② 電気泳動の終わったアガロースゲルをDNA染色液のタッパーに入れ、2分間ゆっくりと手で振盪する（2分以上染色を続けると脱色がきれいにできなくなりますので、時間を厳守してください）。

⑤ 精製水にアガロースゲルを移し、DNA断片のバンドが確認できるまで精製水を交換しながらゆっくりと手で振盪する。

⑥ 観察（デジタルカメラ等でアガロースゲルを撮影することが可能です。

付録1　電気泳動について

泳動バッファー

DNA断片の電気泳動では、一般にTAE bufferやTBE bufferが用いられます。TAE bufferは数kb以上の比較的長いDNA断片の分離に適しているのに対して、TBE bufferはそれよりも短いDNAの分離に適しています。

アガロースゲルの濃度

電気泳動法によるDNAの分離実験では、ゲルの作成の際のアガロースの濃度が非常に重要となります。アガロースの濃度が高いほどゲルマトリックスが密になるため、より細かいDNA断片の解析が可能となります。よって分離したいDNA断片の長さによって適切なアガロース濃度を選択することが大切です。下表は、分離したいDNA断片の長さと推奨するアガロース濃度を示しています。本キットでは、0.7%のアガロースゲルを使用することを推奨しています。

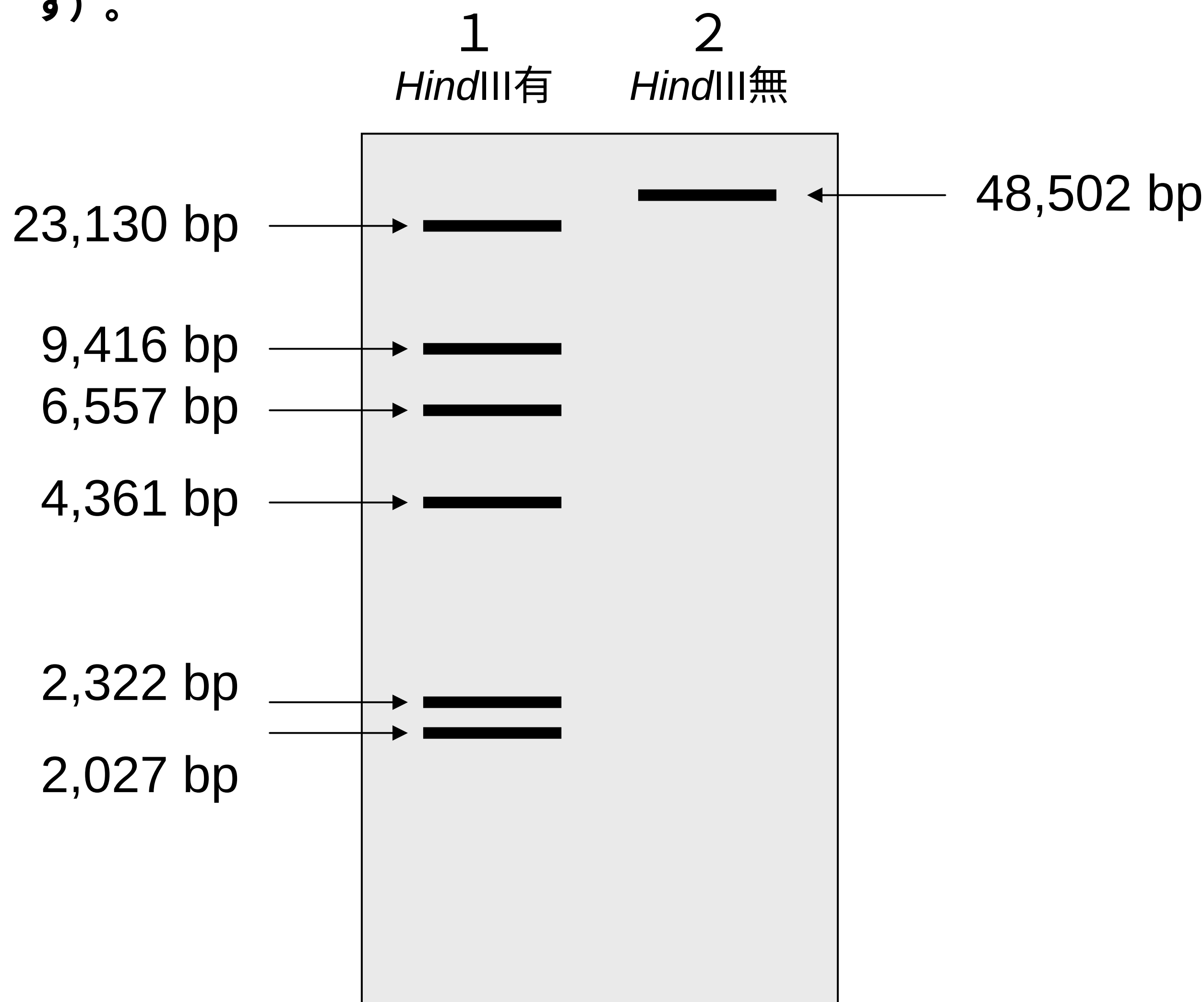
アガロース濃度 (%)	分離できるDNA断片の長さ (bp)
0.6	1,000～20,000
0.7	800～10,000
1	500～7,000
1.2	400～6,000
1.5	200～3,000
2	100～2,000

付録2　予想されるバンド像

*Hind*IIIはラムダDNAを7箇所で切断する

　*Hind*IIIはラムダDNAの中にあるAAGCTTという配列を認識し切断します。このようなDNA配列はラムダDNAの中に7箇所存在しています。つまり*Hind*IIIによる切断後には8本のDNA断片が存在することになりますが、アガロースゲル電気泳動法では、これらのうち6本のバンドについて目で確認することができます（2本についてはDNA断片が短いため、0.7%アガロースゲルを用いた電気泳動での確認は難しくなっています）。

　下図に、6本のバンドの長さとアガロースゲル電気泳動でのバンド像を示します（バンド像はアガロースの濃度によって、多少変化します）。



付録3　いろいろな制限酵素

制限酵素は100種類以上存在する

　細菌は種類によって、認識するDNA配列の異なる制限酵素を持っています。本キットで使用した*Hind*IIIい外にも100種類以上の制限酵素がこれまでに発見され、遺伝子工学用の酵素試薬として販売されています。

　下表では、その中から6塩基のDNA配列を認識し切断する代表的な制限酵素を示しています。認識配列の１文字目とそれに対応する6文字目が縦軸に、2、3文字目とそれに対応する5、4文字目が横軸になっています（本キットで用いたAAGCTTを認識する*Hind*IIIを赤字で示しています）。

	AATT	ACGT	AGCT	ATAT	CATG	CCGG	CGCG	CTAG	GATC	GCGC	GGCC	GTAC	TATA	TCGA	TGCA	TTAA
A____T			*Hind* III		*Pci* I	*Age* I	*Mlu* I	*Spe* I	*Bgl* II							
A____T		*Acl* I												*Cla* I		*Ase* I
A____T				*Ssp* I						*Afe* I	*Stu* I	*Sca* I				
A____T																
A____T															*Nsi* I	
C____G	*Mfe* I				*Nco* I	*Xma* I		*Avr* II			*Eag* I	*Bsi*W I		*Xho* I		*Afl* II
C____G				*Nde* I												
C____G		*Pml* I	*Pvu* II			*Sma* I										
C____G							*Sac* II		*Pvu* I							
C____G															*Pst* I	
G____C	*Eco*R I					*Ngo*M IV	*Bss*H I	*Nhe* I	*Bam*H I	*Kas* I	*Psp*OM I	*Acc*65 I		*Sal* I	*Apa*L I	
G____C										*Nar* I						
G____C			*Ecl*136 II	*Eco*R V		*Nae* I				*Sfo* I			*Bst*Z17 I			*Hpa* I
G____C																
G____C		*Aat* II	*Sac* I		*Sph* I					*Bbe* I	*Apa* I	*Kpn* I				
T____A					*Bsp*H I	*Bsp*E I		*Xba* I	*Bcl* I			*Bsr*G I				
T____A														*Bst*B I		
T____A		*Sna*B I					*Nru* I			*Fsp* I	*Msc* I		*Psi* I			*Dra* I
T____A																
T____A																

ご使用上の注意

本製品は、バイオ教育を目的として開発されたキットです。本取扱説明書に記載されたプロトコル以外での使用につきましては、保証の限りではございません。

商品のご返品について

商品のご返品につきましては、弊社の確認を必要とさせていただきます。この確認なしでのご返品はご遠慮ください。適切な保存、ご使用をされていない製品についてはご返品をお受けできない場合がございます。また、品質保持のために返品された製品を再販することは一切ございません。

カスタマーサポート

Feel so Bioシリーズ　カスタマーサポート係

FAX：03－3656－2870

Mail：info@feelsobio.net

※FAXをご利用の場合は、同封のFAX用紙にご記入の上ご送信ください。

製造・販売元



株式会社リバネス
〒124-0024
東京都葛飾区新小岩3-25-1-208
TEL/FAX 03-3656-2870
URL：http://www.leaveanest.com/

販売



コスモ・バイオ株式会社
〒135-0016　東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル
TEL：（03）5632-9610　FAX：（03）5632-9619
e-mail：mail@cosmobio.co.jp
URL：http://www.cosmobio.co.jp/